




## Method for the quantitative analysis of sample liquid

**Patent number:** DE4331596  
**Publication date:** 1995-03-23  
**Inventor:** BACKHAUS JUERGEN DR RER NAT (DE); MISCHLER REINHOLD (DE)  
**Applicant:** BOEHRINGER MANNHEIM GMBH (DE)  
**Classification:**  
- international: G01N21/55; G01J3/42; G01N33/18; G01N33/02; G01N33/48; G01N33/15  
- european: B01L3/00C2D; G01N21/35; G01N21/47  
**Application number:** DE19934331596 19930917  
**Priority number(s):** DE19934331596 19930917

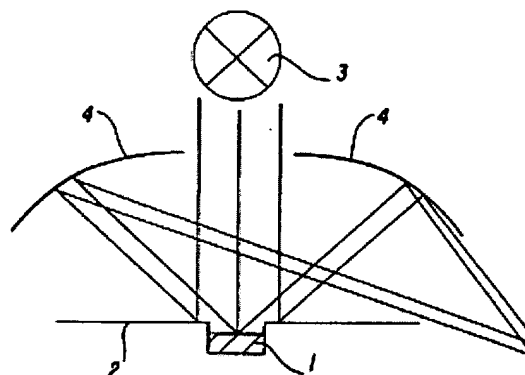
**Also published as**

 EP064441:  
 US560583:  
 EP064441:

**Report a data error**

Abstract not available for DE4331596  
Abstract of corresponding document: **US5605838**

The invention concerns a method for the quantitative analysis of sample liquids. A sample is dried and irradiated with visible and/or infrared light. Light that is diffusely or specularly reflected from the sample and sample carrier is detected and analysed. Furthermore the invention concerns a system for carrying out the method according to the invention and a sample carrier having a diffusely or specularly reflecting surface.



---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



DEUTSCHES

PATENTAMT

②1 Aktenzeichen: P 43 31 596.8

②2 Anmeldetag: 17. 9. 93

④3 Offenlegungstag: 23. 3. 95

DE 43 31 596 A 1

⑦1 Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

⑦2 Erfinder:

Backhaus, Jürgen, Dr.rer.nat., 68535  
Edingen-Neckarhausen, DE; Mischler, Reinhold,  
67063 Ludwigshafen, DE

⑤4 Verfahren zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten. Eine Probe wird eingetrocknet und mit sichtbarem und/oder infrarotem Licht bestrahlt. Von der gesamten Probe diffus reflektiertes Licht wird detektiert und ausgewertet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein System zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens und Probenträger mit diffus reflektierender Oberfläche.

DE 43 31 596 A 1

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten durch Bestrahlen einer im wesentlichen von Lösungsmittel befreiten Probe und Detektieren von diffus von der Probe reflektierter Strahlung. Außerdem beinhaltet die Erfindung ein System zur Analyse von Probenflüssigkeiten, in dem im wesentlichen von Lösungsmittel befreiten Proben, die sich auf einem Probenträger befinden, bestrahlt werden und von der Probe ausgesandte Strahlung mit einer Detektionsvorrichtung detektiert wird. Die Erfindung umfaßt außerdem einen Probenträger zur Verwendung in einem erfindungsgemäßen System, bei dem sich eine diffus reflektierende Metallschicht auf einem Träger befindet.

Im Stand der Technik sind Verfahren zur qualitativen Analyse von Probenflüssigkeiten bekannt, bei denen Feststoffe, Dünnschichtchromatogramme oder Trocknungsreste mit Infrarotstrahlung beleuchtet und reflektierte Strahlung ausgewertet wird, um Informationen über in der Probe enthaltene Substanzen zu erhalten. In der Offenlegungsschrift DE-A-42 33 321 wird ein Mikroanalyseverfahren beschrieben, bei dem Probenflüssigkeit auf einen Kunststoffträger mit Positionierhilfen aufgebracht und nachfolgend eingetrocknet wird. Die beschriebenen Maßnahmen zielen darauf ab, eine möglichst große Schichtdicke und eine möglichst ebene Struktur des Trocknungsrestes zu erzielen. In dem beschriebenen System wird lediglich ein Teil des Trocknungsrestes mit Infrarotstrahlung bestrahlt und spiegelnd reflektierte Strahlung ausgewertet. Da nur ein Teil des Trocknungsrestes durchstrahlt wird, ist eine quantitative Auswertung nur dann möglich, wenn genau definierte Abmessungen des Trocknungsrestes sichergestellt werden können, was in der Praxis nur mit sehr großem Aufwand möglich ist.

Im Stand der Technik sind weiterhin Verfahren zur Analyse von Flüssigkeiten bekannt, bei denen z. B. Fruchtsäfte auf ein Glasfaservlies aufgebracht werden und durch Detektion von reflektierter Infrarotstrahlung analysiert werden. Die Strahlung durchdringt dabei nur die Oberflächenschicht des Vlieses, was dazu führt, daß das Verfahren für eine quantitative Auswertung empirisch kalibriert werden muß und daher durch eine wechselnde Mikrostruktur des Glasfaservlieses gestört wird. Die Patentanmeldung WO 90/15981 befaßt sich mit der Trocknung von Filtermaterialien, auf die Probenflüssigkeiten aufgebracht wurden. Das Trocknungsverfahren stellt bei dieser Anwendung ein zentrales Problem dar, weil bei der Trocknung eine unkontrollierte Migration der Probenbestandteile eintritt, welche die Homogenität des Trocknungsrückstandes negativ beeinflusst. Bei dem in WO 90/15981 beschriebenen Analyseverfahren und auch bei der Auswertung von Dünnschichtchromatographien mit Scannen durchdringt die Strahlung nur einen Teil der Probe.

Der Stand der Technik weist den Nachteil auf, daß eine quantitative Analyse von Probenflüssigkeiten durch Messung der von der Probe reflektierten IR-Strahlung nur möglich ist, wenn aufwendige Maßnahmen bei der Probenvorbereitung ausgeführt werden. Mit im Stand der Technik bekannten Methoden ist es im besonderen nur ungenügend möglich, quantitative Analysen durchzuführen, wenn Stoffgemische vorliegen.

Aufgabe der Erfindung war es, ein Verfahren und ein System zur quantitativen Analyse von eingetrockneten Probenflüssigkeiten zur Verfügung zu stellen, das Nach-

teile bekannter Verfahren nicht aufweist. Insbesondere soll die Probenvorbereitung für das Analyseergebnis unkritisch sein und keine speziellen Maßnahmen erfordern. Außerdem war es Aufgabe der Erfindung, die quantitative Analyse von mehreren Analyten nebeneinander zu ermöglichen.

Es wurde ein Verfahren zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten gefunden, das die Schritte

- Aufbringen einer definierten Menge Probenflüssigkeit auf eine Oberfläche,
- Trocknung der Probenflüssigkeit zur Erzielung eines Trocknungsrestes, dessen Lösungsmittelgehalt unter 20 Gewichtsprozent liegt,
- Bestrahlung des Trocknungsrestes mit Strahlung aus dem infraroten und/oder sichtbaren Bereich des Spektrums mit einem Strahlenkegel in der Weise, daß sich der Trocknungsrest vollständig im Strahlenkegel befindet,
- Detektierung mindestens eines Teils der Strahlung, die von dem gesamten Trocknungsrest diffus reflektiert wurde,
- Auswertung der detektierten Strahlung zur Berechnung der Konzentration eines oder mehrerer Inhaltsstoffe der Probenflüssigkeit beinhaltet. Weiterhin betrifft die Erfindung ein System zur Ausführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens und Probenträger, die für eine Verwendung im erfindungsgemäßen System geeignet sind.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren wird eine kleine Probenmenge auf eine Oberfläche eines Probenträgers aufgegeben und nachfolgend eingetrocknet. Die Aufgabe von Probenflüssigkeit kann mit einer Mikropipette erfolgen. Bevorzugt werden Probenmengen unter 50 µl, besonders bevorzugt Probenmengen zwischen 0.1 und 10 µl verwendet. Da der gesamte Trocknungsrest der Probenflüssigkeit ausgewertet wird, nutzt das Verfahren die Probenmenge optimal aus.

Als Probenflüssigkeiten sind solche Flüssigkeiten geeignet, die bei Eintrocknung einen festen Rückstand hinterlassen. Dies können z. B. Wasserproben, Fraktionen von Trennprozessen, Lebensmittel und Naturprodukte sein. Besonders vorteilhaft kann das erfindungsgemäße Verfahren im Bereich der klinischen Diagnostik, z. B. von Blut, Plasma, Serum, Harn, Speichel oder Tränenflüssigkeit eingesetzt werden.

Die Eintrocknung der Probenflüssigkeit kann sowohl passiv, d. h. als Verdunstung des oder der Lösungsmittel erfolgen, oder durch spezielle Vorrichtungen aktiv gesteuert werden. Eine Trocknung kann beispielsweise durch Aufblasen von Luft, Erwärmung, Anlegen eines Unterdruckes oder Mikrowellenstrahlung erfolgen.

Das in der Probenflüssigkeit enthaltene Lösungsmittel kann sowohl ein Einzelstoff als auch ein Gemisch verschiedener Stoffe sein. Als Bestandteil des Lösungsmittels kommen Wasser und im Stand der Technik bekannte organische und anorganische Lösungsmittel in Betracht. Ein vorteilhafter Aspekt eines erfindungsgemäßen Verfahrens ist die weitgehende Entfernung des Lösungsmittels, da auf diese Weise störende Strahlungsabsorptionen, die Absorptionen von Analyten überdecken können, weitgehend eliminiert werden.

Erfindungsgemäß wird die Probenflüssigkeit nicht vollständig, sondern nur zum Teil eingetrocknet. Als vorteilhaft hat sich ein Restgehalt an Lösungsmittel von ca. 1% bis 20% herausgestellt. Bei vollständiger Eintrocknung entstehen amorphe Pulver, die eine reprodu-

zierbare spektroskopische Untersuchung erschweren.

Die Gestalt des durch eines der genannten Trocknungsverfahren erhaltenen Trocknungsrestes kann in einem erfindungsgemäßen Verfahren in weiten Grenzen variieren, ohne daß eine quantitative Auswertung verhindert wird. Demnach sind spezielle Maßnahmen, wie z. B. das Pressen des Trocknungsrückstandes, um eine glatte Oberfläche zu erzielen oder das Pressen in eine Form nicht notwendig. Dies ist in sofern wichtig, da die Form des Trocknungsrestes erheblich vom Trocknungsverfahren und der Art der Probenflüssigkeit abhängig ist und somit nur teilweise reguliert werden kann. Es kann erfindungsgemäß jedoch vorteilhaft sein, die Probenflüssigkeit in Vertiefungen einzutrocknen, um eine Ausspreitung der Flüssigkeit zu begrenzen oder Trocknungsverfahren anzuwenden, die eine bestimmte Form des Trocknungsrestes begünstigen.

Einen zentralen Aspekt der Erfindung stellt die Oberfläche des Probenträgers dar, auf welche die Probenflüssigkeit zur Trocknung aufgegeben wird. Die Oberfläche ist erfindungsgemäß so beschaffen, daß die Probenflüssigkeit im wesentlichen nicht in sie eindringen kann. Da jede reale Oberfläche eine gewisse Porosität aufweist, findet stets ein geringfügiges Eindringen in die Oberfläche statt. Erfindungsgemäß werden Oberflächen verwendet, die aufgrund ihrer geringen Porosität nur einen sehr kleinen Teil Probenflüssigkeit (z. B. kleiner 1%) der Bestrahlung durch den Meßstrahl entziehen.

Die genannten Oberflächen können z. B. Metall- oder metallisierte Kunststoffoberflächen sein. Bei der ersten Variante ist die Oberfläche so beschaffen, daß sie die Meßstrahlung diffus reflektiert. Solche Oberflächen können erhalten werden, indem Metalle, wie z. B. Aluminium, Silber, Platin, Gold oder Legierungen, wie z. B. Messing, an ihrer Oberfläche so behandelt werden, daß sie makroskopisch eben sind, jedoch eine Oberflächenrauigkeit von ca. 1 bis 200 m aufweisen. Solche Rauhtiefen können beispielsweise durch Sandstrahlen der jeweiligen Oberfläche mit Sanden geeigneter Körnung oder durch Aufrauen einer Oberfläche mit Schleifmitteln erzielt werden. Erfindungsgemäß bevorzugt sind Oberflächen von Probenträgern. Bei denen eine dünne, gut reflektierende Metallschicht aus z. B. Chrom, Silber, Platin und insbesondere Gold auf ein rauhes Substrat aufgebracht ist. Da die Metallschichten in der Regel sehr dünn sind, weil sie aufgedampft oder gesputtert werden, muß das Trägermaterial bereits eine Rauigkeit aufweisen, die eine diffuse Reflektion der Meßstrahlung gewährleistet. Bevorzugte Rauhtiefen liegen im Bereich von 5 bis 50 µm.

Das Trägermaterial kann seinerseits aus einem der genannten Metalle oder Legierungen bestehen oder aus einem Kunststoff z. B. Polyethylen, Polypropylen, Polymethacrylat, Polycarbonat, Polystyrol gefertigt sein. Probenträger oder Trägermaterialien, die gepreßt oder gegossen werden, können direkt beim Herstellungsprozeß mit einer geeigneten Oberflächenrauigkeit versehen werden.

Bei einer weiteren erfindungsgemäßen Ausführungsform ist die Oberfläche so beschaffen, daß die Probenflüssigkeit nicht in sie eindringen kann, jedoch ist die Oberfläche in diesem Fall für die verwendete Strahlung zumindestens teilweise durchlässig. Im Infrarotbereich kommen für diesen Verwendungszweck z. B.  $\text{CaF}_2$ , ZnSe. Polyethylen und perfluorierte Polyethylene in Betracht. Bei Messungen im sichtbaren Spektralbereich kommen Materialien, wie Gläser, Polystyrol und Polyacrylate in Frage. Die Unterseite der strahlungsdurch-

lässigen Träger ist diffus reflektierend, was durch eine Metallisierung mit bereits genannten Materialien erreicht werden kann.

Diese Ausführungsform eines Probenträgers eignet sich besonders für Reagenzienbeschichtungen, da hierbei die diffus reflektierende Schicht nicht in direkten Kontakt mit korrosiven Reagenzien kommt.

Zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens können Strahlungsfrequenzen im Bereich von 300 nm bis 25 µm, bevorzugt von 2.5 bis 25 µm eingesetzt werden. Der als Infrarot bezeichnete Strahlungsbereich soll den Bereich des nahen Infrarots mit umfassen. Erzeugung und Fokussierung genannter Strahlungsarten ist im Stand der Technik hinreichend beschrieben. Es können Strahlungsquellen mit einem kontinuierlichen Spektrum Verwendung finden. Im Rahmen der Erfindung ist jedoch entscheidend, daß Fokussierung des Strahlenbündels und Größe des Trocknungsrestes aufeinander abgestimmt sind. Die Größe des Trocknungsrestes auf der Oberfläche des Probenträgers ist abhängig von der Art der Probenflüssigkeit und der Beschaffenheit der Oberfläche. Erfindungsgemäß befindet sich der Trocknungsrest bei der Messung vollständig im eingestrahlten Strahlungsbündel. Dies macht eine integrale Messung möglich.

Unter einer integralen Messung ist zu verstehen, daß der gesamte Trocknungsrest bestrahlt wird und zumindest ein Teil der vom gesamten Trocknungsrest diffus reflektierten oder diffus gestreuten Strahlung eines durch die Meßanordnung festgelegten Raumwinkels detektiert wird. Die integrale Messung in Kombination mit diffus reflektierenden Oberflächen ermöglicht eine quantitative Auswertung der Messung. Zur Detektion der Strahlung sind im Stand der Technik bekannte Detektoren für den verwendeten Frequenzbereich geeignet. Geeignet sind beispielsweise Halbleiterdetektoren, die mit flüssigem Stickstoff oder Peltierelementen gekühlt sein können. Bevorzugt können Quecksilber-Cadmium-Tellurid-Detektoren oder solche mit deuteriertem Triglycinsulfat eingesetzt werden. Erfindungsgemäß wird Strahlung von dem gesamten Trocknungsrest auf den Detektor geleitet, gegebenenfalls können Fokussiereinrichtungen, wie z. B. Parabolspiegel oder Sammellinsen vorgeschaltet werden. Ebenfalls können Infrarotmikroskope eingesetzt werden, wobei jedoch in der Regel eine Sammelvorrichtung vorgeschaltet werden muß, um von dem gesamten Trocknungsrest diffus reflektierte oder diffus gestreute Strahlung aufzufangen. Es ist erfindungsgemäß ausreichend, wenn nur ein Teil der vom Trocknungsrest ausgehenden Strahlung aufgefangen wird, der jedoch repräsentative Beiträge vom gesamten Trocknungsrest besitzen muß.

Die Erzeugung und Detektion der Strahlung kann mit klassischen Gitter- oder Prismenspektrometer erfolgen, bevorzugt sind jedoch im Stand der Technik bekannte Fourier-Transform-Spektrometer.

Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren befindet sich eine dünne, von Lösungsmittel befreite Schicht Analysenprobe auf einer Oberfläche, in die sie nicht eindringen kann. Die geringe Schichtdicke der Probe gewährleistet, daß der verwendete Meßstrahl alle Schichten der Probe durchdringen kann, was für eine quantitative Auswertung der Messung von entscheidender Bedeutung ist. Bei erfindungsgemäßer Anordnung wird der Meßstrahl in der Probe mehrfach innerhalb der Probe gestreut, ehe er an der reflektierenden Oberfläche des Probenträgers reflektiert wird und von dort, gegebenenfalls nach weiterer mehrmaliger Streuung in der

Probe zur Detektion gelangt. Dies führt zu einer Steigerung der Signalausbeute im Gegensatz zur Transmissionsanordnung, da der effektive Lichtweg innerhalb der Probe verlängert wird. Eine weitere Steigerung der Meßempfindlichkeit resultiert daraus, daß die Probe von Lösungsmittel weitgehend befreit ist. Auf diese Weise werden störende Strahlungsabsorptionen durch das/die Lösungsmittel verringert. Zusätzlich kommt der Effekt hinzu, daß durch das Abdampfen des/der Lösungsmittel eine Aufkonzentration der Komponenten im Trocknungsrückstand eintritt, die ebenfalls zu einer Empfindlichkeitssteigerung führt.

Durch Auswertung der erhaltenen Spektren mit chemometrischen Verfahren wird eine Mehrkomponentenanalyse möglich. Im Stand der Technik sind chemometrische Verfahren bekannt, mit denen eine Mehrkomponentenanalyse durchgeführt werden kann, wie z. B. partial least squares (PLS), principle component regression (PCR) und Neuronale Netze (NN). Eine Beschreibung möglicher Auswerteverfahren zur Bestimmung eines oder mehrerer Analyten in einem Substanzgemisch wurde z. B. von D. Haaland in SPIE Vol. 1575, 8th International Conference on Fourier Transform Spectroscopy (1991) Seiten 87—95, gegeben. Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es, daß bei Verwendung chemometrischer Methoden zwei oder mehrere Analyten nebeneinander nachgewiesen werden können.

Die Erfindung umfaßt weiterhin ein System zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten, das eine Strahlungsquelle, deren Strahlung im Bereich von 300 nm bis 25 µm liegt, einen Probenträger, der zumindest in Teilbereichen Strahlung diffus reflektiert, eine Dosiervorrichtung zur Aufgabe von Probenflüssigkeit auf den Probenträger, eine Detektionsvorrichtung für von der Probe ausgesandte Strahlung und eine Auswerteeinrichtung für Signale der Detektionsvorrichtung beinhaltet und dadurch gekennzeichnet ist, daß Dosierung der Probenflüssigkeit und Fokussierung so aufeinander abgestimmt sind, daß die Probe auf dem Probenträger vollständig von Strahlung der Strahlungsquelle erfaßt wird.

Bei einem erfindungsgemäßen System werden Fokussierung und Dosierung aufeinander abgestimmt. Eine Fokussierung von Strahlung im infraroten oder sichtbaren Bereich kann mit Linsensystemen und Blenden erfolgen, wobei im Infrarotbereich Linsen aus  $\text{CaF}_2$ , KCl, KBr und anderen Materialien eingesetzt werden müssen, die eine ausreichende Durchlässigkeit für den zu messenden Spektralbereich besitzen.

Die für die Erfindung wichtige Bedingung, daß sich die Probe vollständig im Strahlkegel der Strahlungsquelle befindet, kann auch dadurch erfüllt werden, daß die Größe der Probe geeignet begrenzt wird. Dies kann dadurch erreicht werden, daß nur eine geringe Menge Probenflüssigkeit aufgegeben wird, die auf der Oberfläche des Testträgers eine Fläche einnimmt, die kleiner als der auf den Testträger fallende Strahlungskegel ist. Die von der aufgegebenen Flüssigkeit beanspruchte Fläche ist zum einen abhängig von der Art der Flüssigkeit, im besonderen ihrer Viskosität und Oberflächenspannung, und zum anderen von der Beschaffenheit der Oberfläche. Demgemäß kann die Oberfläche behandelt werden, um ihre Beschaffenheit zu ändern. Die Oberfläche des Testträgers kann mechanisch modifiziert werden, so daß sie Vertiefungen besitzt, in die die Probenflüssigkeit gegeben wird. Die Vertiefungen können beispielsweise Ränder aufweisen, die senkrecht zur Oberfläche des Testträgers abgebildet sind, oder schräge Ränder. Eben-

falls sind Vertiefungen in Form von Kugelsegmenten oder Paraboloidsegmenten möglich. Eine weitere Möglichkeit, die Ausbreitung von Probenflüssigkeit auf einen definierten Bereich zu beschränken, besteht darin, eine Oberfläche mit diffus reflektierenden Eigenschaften mit einer Matrix zu beschichten, die Aussparungen besitzt. Es kann z. B. eine Teflonmaske aufgespritzt werden, die für wäßrige Probenflüssigkeiten eine hydrophobe Sperre darstellt und somit eine Ausspreitung der Probenflüssigkeit verhindert.

In der Praxis wird es nicht zu verhindern sein, daß das detektierte Signal Informationen der Oberfläche des Trägers enthält, da der Strahlungskegel den Trocknungsrest vollständig erfaßt und in der Regel auch angrenzende Stellen der Oberfläche des Probenträgers mit bestrahlt. Für den Probenträger und speziell dessen Oberfläche können Materialien ausgewählt werden, die in Spektralbereichen, die für die Analyse von Bedeutung sind, keine Störung hervorrufen. Besitzen genannte Materialien im Frequenzbereich der Messung eine konstante Absorption, so kann diese vom Meßspektrum subtrahiert werden.

Ein weiterer Bestandteil der Erfindung ist ein Probenträger, bei dem auf mindestens einer Oberfläche eines Trägers eine reflektierende Schicht aufgebracht ist, wobei die resultierende mindestens eine Oberfläche dadurch gekennzeichnet ist, daß sie eine Rauhtiefe von 1 bis 200 µm, vorzugsweise von 5 bis 50 µm, aufweist.

Erfindungsgemäß ist es von Bedeutung, daß die Oberflächen, auf welche die Probenflüssigkeit aufgegeben wird, Licht diffus reflektiert. Erfindungsgemäße Rauhtiefe kann durch Behandlung der Oberfläche mit Schleifmaterialien, Sandstrahlen, Ätzen usw. erzeugt werden. Wie bereits an anderer Stelle beschrieben, kann der Probenträger aus einem Trägermaterial und einer darauf aufgetragenen, reflektierenden Schicht bestehen.

Bei einer weiteren Variante befinden sich Reagenzien auf dem Probenträger, die mit nachzuweisenden Analyten in charakteristischer Weise reagieren. Bevorzugt befinden sich diese Reagenzien in Vertiefungen der Probenträger. Besonders wichtig ist die Möglichkeit der Analyse unter Zusatz von Reagenzien für Enzyme, Elektrolyte, Hormone, Proteine und andere Analyte, die nur in sehr kleinen Konzentrationen auftreten. Bei Enzymen kann beispielsweise die Enzymaktivität genutzt werden, um Farbstoffe freizusetzen, die ihrerseits nachgewiesen werden.

Bei Verwendung von Reagenzien auf dem Probenträger sind solche Ausführungsformen der Probenträger bevorzugt, bei denen sich die Reagenzien auf einer inerten Trägerschicht befinden. Werden z. B. Kunststoffe als Trägermaterialien eingesetzt, so befindet sich die Metallisierung des Probenträgers bevorzugt auf der dem Reagenz abgewandten Seite, um die Korrosion der Metallisierung durch Reagenzieneinwirkung zu verhindern.

Die folgenden Figuren sollen zur Verdeutlichung der Erfindung dienen.

Fig. 1 Anordnung zur Messung in diffuser Reflektion,

Fig. 2 Probenträger, einfache Ausführung,

Fig. 3 Probenträger, erweiterte Ausführung,

Fig. 4 Methodenvergleich einer Glucose-Bestimmung in Humansenen,

Fig. 5 Methodenvergleich einer Triglycerid-Bestimmung in Humansenen.

In Fig. 1 ist eine Anordnung zur Messung der diffusen Reflektion eines Trocknungsrestes dargestellt. Der Trocknungsrest 1 befindet sich auf einem aufgerauhten Probenträger 2, der oberflächlich metallisiert ist. Das

von der Strahlungsquelle 3 ausgesandte Strahlungsbündel tritt durch die Apertur des Parabolspiegels 4 auf den Trocknungsrest 1. Von diesem wird Strahlung diffus reflektiert und vom Parabolspiegel 4 auf den Detektor 5 gelenkt. Das von der Strahlungsquelle 3 ausgehende Strahlungsbündel ist so groß, daß es den Trocknungsrest 1 voll erfaßt und auch einen Teil des Probenträgers 2 beleuchtet.

Fig. 2A und B zeigen einen Probenträger 10, der in einem erfindungsgemäßen System verwendet werden kann. Auf einem Trägermaterial aus Polystyrol ist eine Goldschicht von ca. 200 nm Dicke aufgesputtert. Die Vertiefung 11 in der Mitte des Probenträgers besitzt einen Durchmesser von 2,5 mm und eine Tiefe von 0,5 mm. Das Trägermaterial hat eine mittlere Rauhtiefe von ca. 15 µm.

In Fig. 2C ist ein Probenträger 10 dargestellt, der eine Vielzahl von Vertiefungen 11 aufweist. Diese Anordnung ist vorteilhaft, wenn z. B. Blutproben mehrerer Personen analysiert werden sollen oder wenn Probenmaterial aus einer Quelle mit unterschiedlichen Reagenzien versetzt werden soll.

Fig. 3 zeigt unterschiedliche Ausführungsformen von Probenträgern. Der Probenträger 20 in Fig. 3A besitzt eine Trägerschicht 21 aus Polystyrol, auf die ein Metallfilm 22 aus Gold aufgebracht ist. Die Vertiefung 23 des Probenträgers ist mit einer Saugschicht aus einem inerten Material, z. B. Titandioxid oder Kieselgel, gefüllt. Diese Saugschicht dient dazu, ein gleichmäßiges Ausstreuen der Flüssigkeit zu erzielen sowie die diffuse Streuung in der Probe zu verstärken. Die Saugschicht ist so dünn, daß sie von der verwendeten Strahlung durchdrungen werden kann.

Fig. 3B zeigt einen Probenträger 30, bei dem sich auf einer Trägerschicht 31 aus Polystyrol ein Goldfilm 32 befindet. Auf den Goldfilm 32 ist eine dünne Saugschicht aus Titandioxid als Erhöhung 33 aufgebracht. Durch die Saugeigenschaften dieser Schicht wird die Ausbreitung der Probenflüssigkeit auf den Bereich der Erhöhung beschränkt.

In einer erfindungsgemäßen Ausführung mit Reagenzien auf dem Trägermaterial können diese beispielsweise in die Saugschicht eingebettet und darin fixiert werden. Beim Aufbringen einer Probe findet dann eine gleichzeitige Ausbreitung und Vermischung mit Reagenzien statt. Die reflektierende Metallschicht befindet sich hierbei bevorzugt auf der zur Saugschicht abgewandten Seite des zumindest teilweise transparenten Trägers.

In Fig. 3C ist eine weitere Ausführungsform eines Probenträgers 40 dargestellt. Wiederum besteht die Trägerschicht 41 aus Polystyrol, auf das ein Goldfilm 42 aufgebracht ist. Auf dem Goldfilm 42 befindet sich eine Teflonschicht 43, die Aussparungen 44 besitzt, in die Probenflüssigkeit gegeben werden kann. Da Teflon stark hydrophobe Eigenschaften besitzt, kann sich eine hydrophile Probenflüssigkeit nicht über eine Einsparung 44 hinausbewegen.

#### Bezugszeichenliste

- 1 Trocknungsrest
- 2 Probenträger
- 3 Strahlungsquelle
- 4 Parabolspiegel
- 5 Detektor
- 10 Probenträger
- 11 Vertiefung

- 20 Probenträger
- 21 Trägerschicht
- 22 Metallfilm
- 23 Vertiefung
- 30 Probenträger
- 31 Trägerschicht
- 32 Metallfilm
- 33 Erhöhung
- 40 Probenträger
- 41 Trägerschicht
- 42 Metallfilm
- 43 hydrophobe Schicht
- 44 Aussparungen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern:

#### Beispiel 1: Glucosebestimmung in Serum

5 µl Serum wurden mit einem Dispenser aus einer Serumprobe aufgesaugt. Von den 5 µl wurde 1 µl auf eine ebene, diffus reflektierende, Oberfläche eines Probenträgers mit einer mittleren Rauhtiefe von ca. 15 µm pipettiert. Das Material des Probenträgers war vergoldetes Messing. Der Probenträger wurde bei Raumtemperatur ca. 1/2 Stunde stehen gelassen, wodurch der Tropfen eintrocknete. Der Trocknungsrest wurde in diffuser Reflektion mit einem System gemäß Fig. 1 integral vermessen. Die Messung muß in einem Zeitfenster von ca. 30 min bis max. 5 Stunden durchgeführt werden, da sonst Veränderungen an der eingetrockneten Probe auftreten, die zu unreproduzierbaren Ergebnissen führen.

Für das Beispiel Glucose wurde aus dem Spektrum ein Bereich zwischen 950 bis 1200 Wellenzahlen ausgewählt, auf den das PLS-Verfahren (partial least squares) angewendet wurde.

Fig. 4 zeigt einen Methodenvergleich für die Bestimmung von Glucose. Auf der x-Achse sind die Konzentrationen in mg/dl der Bezugsmethode (Hexokinase-Methode) aufgetragen. Auf der y-Achse ist das nach dem PLS-Verfahren aus dem IR-Spektrum bestimmte Vorhersagemodell für Glucose aufgetragen. Die schwarzen Punkte zeigen die Kalibration, mit der das Vorhersagemodell entwickelt wurde. Die weißen Punkte zeigen unbekannte Proben, die nicht in dem Kalibrationsdatensatz enthalten waren und die aufgrund des Spektrums vorausgesagt wurden. Die Abweichungen der weißen Kreise von der Geraden vermitteln einen Eindruck von der Genauigkeit der Methode.

Die Vorhersagegenauigkeit für unbekannte Proben ist vergleichbar mit klassischen enzymatischen Methoden.

#### Beispiel 2: Triglyceridbestimmung in Serum

5 µl Serum wurden von einem Dispenser aus einer beliebigen Serumprobe aufgesaugt. Von den 5 µl wurde 1 µl in eine Vertiefung von 2,5 mm Durchmesser und einer Tiefe von 0,5 mm pipettiert. Das Trägermaterial ist vergoldetes Messing mit einer Rauhtiefe von ca. 15–20 µm. Der Probenträger wurde bei Raumtemperatur ca. 1/2 Stunde stehen gelassen, bis der Tropfen eingetrocknet war. Danach wurde die aufgetragene Serumprobe in diffuser Reflektion mit einem System gemäß Fig. 1 integral vermessen. Die Messung muß in einem Zeitfenster von ca. 30 min bis max. 5 Stunden durchgeführt werden. Die erhaltenen Spektren wurden in einem Frequenzbereich zwischen 2800 und

3080 cm<sup>-1</sup> mit dem PLS-Verfahren Vorhersagemodell erstellt.

Fig. 5 zeigt die Bestimmung von Triglyceriden im Vergleich zur Referenzmessung am klinischen Analyzer Hitachi 704 mit der GPO-PAP-Methode. Die schwarzen Punkte sind die Kalibrationsproben, mit denen das Vorhersagemodell erstellt wurde, die weißen Punkte stellen unbekannte Proben dar, deren Konzentration für die y-Achse auf Grundlage des Vorhersagemodells gewonnen wurde. Auch hier ist die Methode in der Präzision vergleichbar mit klassischen enzymatisch durchgeführten Verfahren.

#### Patentansprüche

1. Verfahren zur quantitativen Analyse von Probenflüssigkeiten, mit den Schritten:
  - Aufbringen einer definierten Menge Probenflüssigkeit auf eine Oberfläche,
  - Trocknung der Probenflüssigkeit zur Erzielung eines Trocknungsrestes, dessen Lösungs- mittelgehalt unter 20 Gewichtsprozent liegt,
  - Bestrahlung des Trocknungsrestes mit Strahlung aus dem infraroten und/oder sicht- baren Bereich des Spektrums, mit einem Strahlenkegel in der Weise, daß sich der Trocknungsrest vollständig im Strahlenkegel befindet,
  - Detektierung mindestens eines Teils der Strahlung, die von dem gesamten Trocknungs- rest diffus reflektiert wurde,
  - Auswertung der detektierten Strahlung zur Berechnung der Konzentration eines oder mehrerer Inhaltsstoffe der Probenflüssigkeit.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem weniger als 50 µl, bevorzugt 0.1 bis 10 µl Probenflüssigkeit auf die Oberfläche in zusammenhängender Form aufgebracht werden.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem die Probenflüssigkeit eine Körperflüssigkeit ist.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die verwendete Strahlung Wellenlängen im Bereich von 300 nm bis 25 µm aufweist.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem die verwendete Strahlung Wellenlängen im Bereich von 2.5 bis 25 µm aufweist.
6. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem die Proben- flüssigkeit im wesentlichen nicht in die Oberfläche eindringen kann.
7. System zur quantitativen Analyse von Proben- flüssigkeiten mit
  - einer Strahlungsquelle, deren Strahlung im Bereich von 300 nm bis 25 µm liegt und eine Vorrichtung zur Fokussierung besitzt,
  - einem Probenträger, der zumindest in Teilberei- chen auftreffende Strahlung diffus reflektiert,
  - einer Dosiervorrichtung zur Aufgabe von Proben- flüssigkeiten auf den Probenträger,
  - einer Detektionsvorrichtung für von der Probe ausgesandte Strahlung
  - und einer Auswertevorrichtung für Signale der De- tektionseinrichtung,
  - dadurch gekennzeichnet, daß Dosierung der Pro- benflüssigkeit und Fokussierung so aufeinander ab- gestimmt sind, daß die eingetrocknete Probe auf dem Probenträger vollständig von Strahlung der Strahlungsquelle erfaßt wird.
8. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge-

mäß Anspruch 7, bei dem der Probenträger zumin- dest stellenweise mit Metall beschichtet ist.

9. System zur quantitativen Analyse von Proben- flüssigkeit gemäß Anspruch 8, bei dem die Oberflä- che, auf welche die Probenflüssigkeit aufgebracht wird, zumindest teilweise transparent ist und bei dem die dieser Oberfläche gegenüberliegende Sei- te mit einer die Strahlung diffus reflektierenden Schicht versehen ist.

10. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß Anspruch 7, bei dem der Probenträger eine Oberflächenrauigkeit von 1 bis 200 µm, vorzugs- weise 5 bis 50 µm, aufweist.

11. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß Anspruch 7 oder 8, bei dem der Probenträger Vertiefungen aufweist, die Probenflüssigkeit auf- nehmen können.

12. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß Anspruch 7, bei dem die Detektionsvorrich- tung ein oder mehrere Halbleiterdetektoren für den jeweiligen Spektralbereich beinhaltet.

13. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß Anspruch 7, bei dem die Detektionsvorrich- tung ein Infrarotmikroskop ist.

14. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß Anspruch 7 oder 8, bei dem der Probenträger mehrere Probenaufgabestellen besitzt.

15. System zur Analyse von Probenflüssigkeiten ge- mäß einem der Ansprüche 7, bis 11, bei dem auf dem Probenträger an einer oder mehreren Stellen Reagenzien aufgebracht sind.

16. Probenträger, bei dem auf mindestens einer Oberfläche eines Trägers eine reflektierende Schicht aufgebracht ist, wobei die resultierende mindestens eine Oberfläche dadurch gekennzeich- net ist, daß sie eine Rauhtiefe von 1 bis 200 µm, vorzugsweise 5 bis 50 µm aufweist.

17. Probenträger gemäß Anspruch 16, dadurch ge- kennzeichnet, daß ein oder mehrere Vertiefungen auf der mindestens einen Oberfläche des Proben- trägers vorhanden sind.

18. Probenträger gemäß Anspruch 16, in dessen Vertiefungen sich Reagenzien befinden.

---

Hierzu 5 Seite(n) Zeichnungen

---

- Leerseite -

FIG. 1

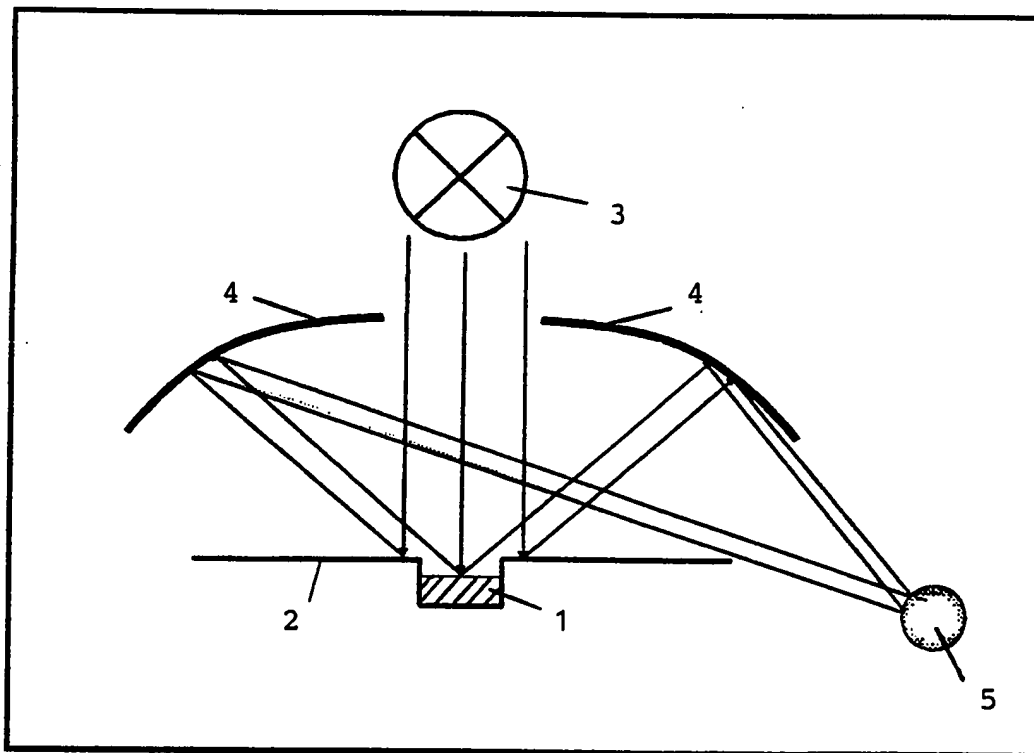


FIG. 2

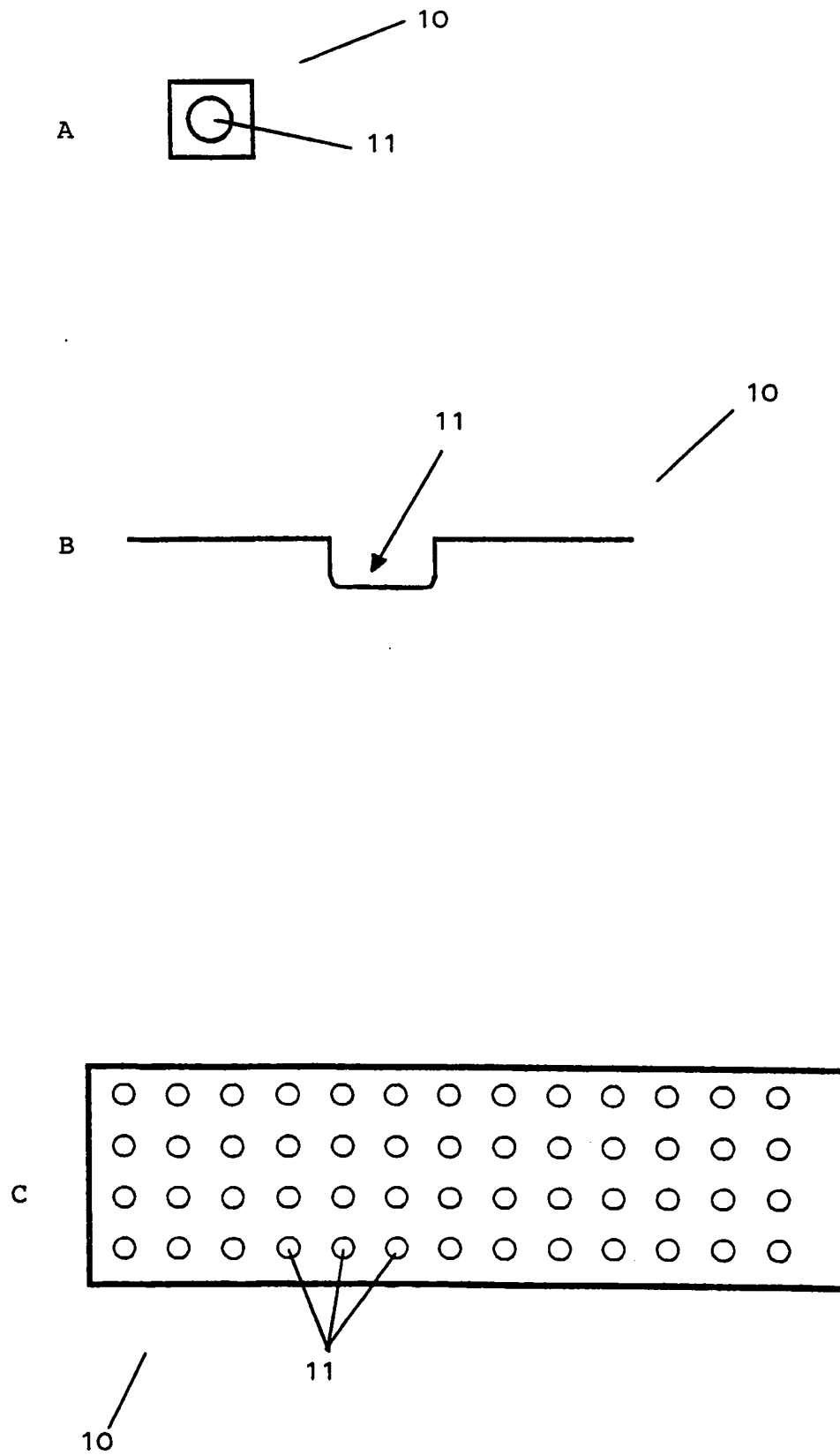


FIG. 3

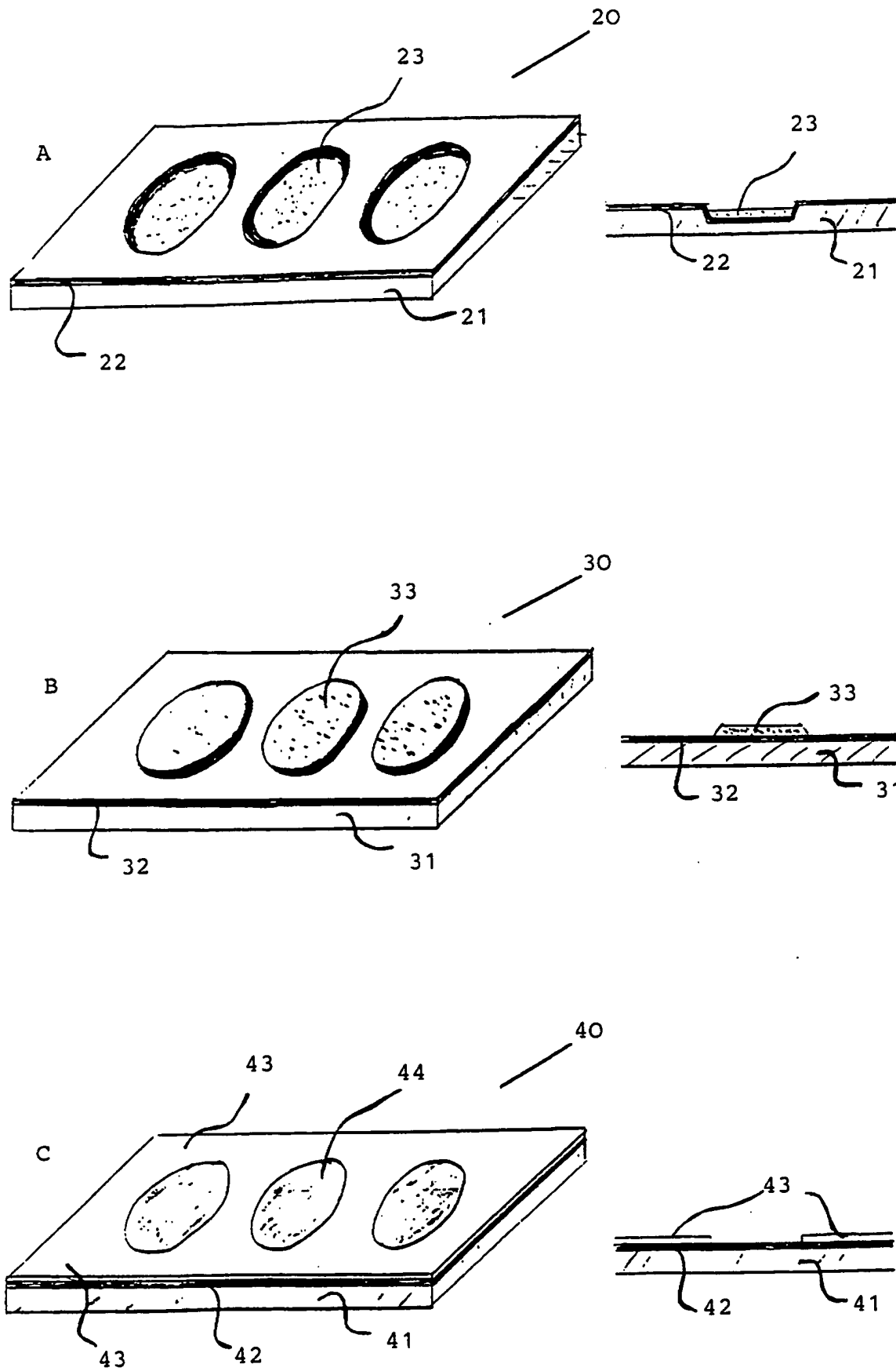


FIG. 4

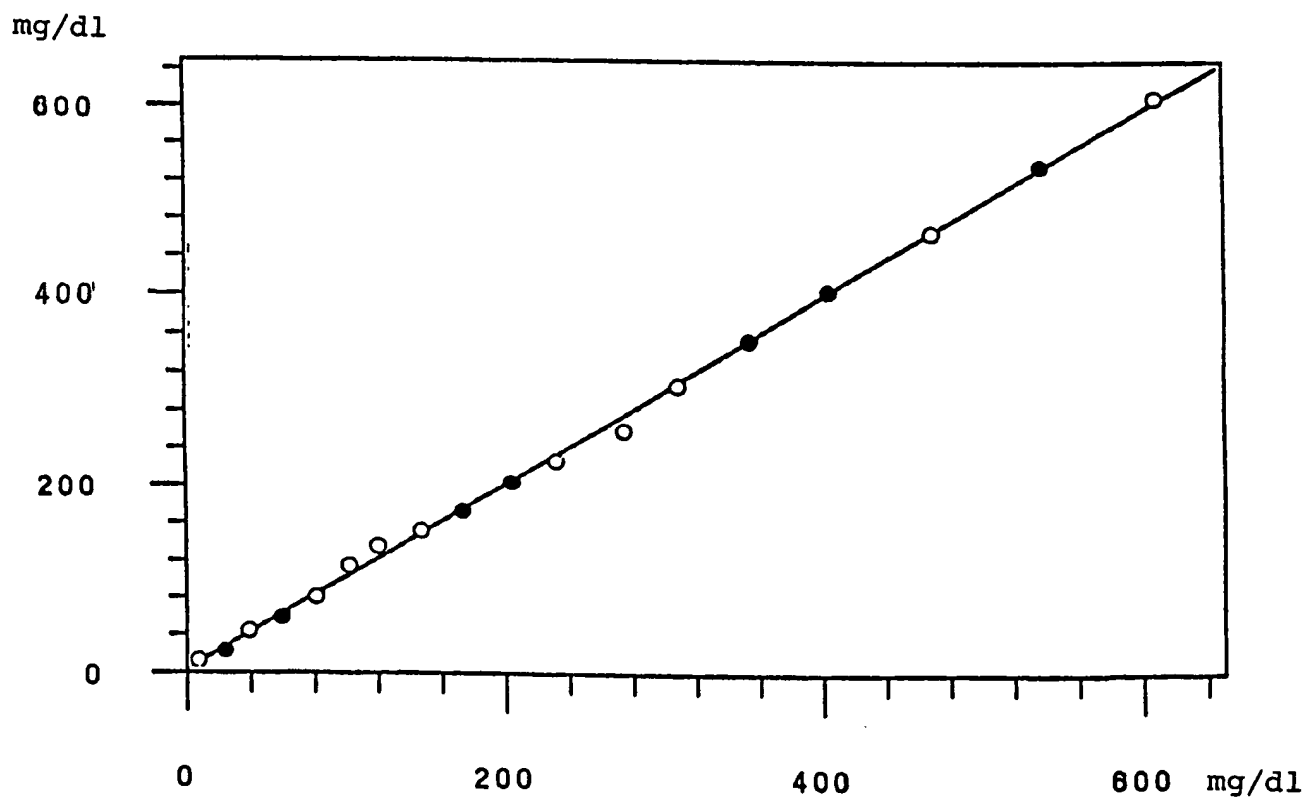


FIG. 5

